

ACTIVATION OF PROTEIN

Patent Number: JP9262093
Publication date: 1997-10-07
Inventor(s): OMAE HIROAKI; SUENAGA MASATO; NISHIMURA TADASHI
Applicant(s): TAKEDA CHEM IND LTD
Requested Patent: JP9262093
Application Number: JP19960074775 19960328
Priority Number(s):
IPC Classification: C12P21/00; C07H21/04; C12N1/21; C12N15/09; C12P21/02
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PROBLEM TO BE SOLVED: To activate a protein of NT-3 (neurotrophin 3) after expression by treating an inclusion body obtained by expressing a protein into a prokaryotic cell host by technique of generic engineering under specific conditions.

SOLUTION: An insoluble and inactive inclusion body obtained by expressing a protein into a prokaryotic cell host by technique of genetic engineering is ground and solubilized with a modifier (e.g. urea) and the modifier is removed and modifying action of a residual modifying agent is lost by an acidic solution (pH1-4) such as hydrochloric acid. Further, a precipitation-preventing agent (e.g. saccharide) for suppressing insolubilization is added thereto and a metal salt such as copper sulfate is added thereto at pH about 4 to 7.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-262093

(43)公開日 平成9年(1997)10月7日

(51)Int.Cl.
C 12 P 21/00
C 07 H 21/04
C 12 N 1/21
15/09
C 12 P 21/02

識別記号
ZNA

序内整理番号

F I
C 12 P 21/00
C 07 H 21/04
C 12 N 1/21
C 12 P 21/02
C 07 K 14/48

技術表示箇所

B
B
H

審査請求 未請求 請求項の数9 OL (全13頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平8-74775

(22)出願日

平成8年(1996)3月28日

(71)出願人 000002934

武田薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号

(72)発明者 大前 弘明

奈良県北葛城郡上牧町服部台2丁目5番2号

(72)発明者 末永 正人

兵庫県西宮市神垣町5番21号 武田薬品夙川寮内

(72)発明者 西村 紀

兵庫県川西市大和西1丁目54番地の16

(74)代理人 弁理士 大多和 明敏 (外1名)

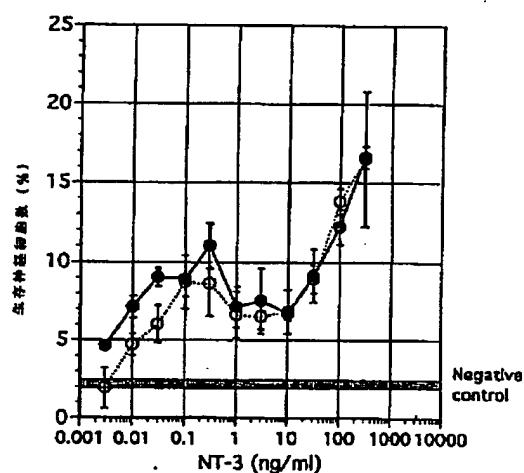
(54)【発明の名称】 蛋白質の活性化方法

(57)【要約】

【課題】遺伝子操作技術を用いて、原核細胞で生産した不活性なNT-3の封入体を、効率的に活性を回復させ、天然源から単離されたNT-3と同じ活性を有する蛋白質を得る方法を提供する。

【解決手段】遺伝子操作技術を用いて、原核細胞中にNT-3を発現後、細胞を破碎し、変性剤で可溶化した後、次いで変性剤を除去し酢酸等の酸性溶液に置換したのち、沈殿防止剤を添加し、次いでpH約4ないし7で金属塩を添加することを特徴とする蛋白質の活性化方法。

CHO及びE. coli由来NT-3の比較



【特許請求の範囲】

【請求項1】蛋白質を遺伝子工学的に原核細胞宿主中に発現させて得られる封入体を変性剤で可溶化し、次いで変性剤を除去し酸性溶液に置換したのち、沈殿防止剤を添加し、pH約4ないし7で金属塩を添加することを特徴とする蛋白質の活性化方法。

【請求項2】金属塩が硫酸銅である請求項1記載の活性化方法。

【請求項3】蛋白質を遺伝子工学的に原核細胞宿主中に発現させて得られる封入体を変性剤で可溶化し、次いで変性剤不作用濃度まで酸性溶液で希釈したのち、沈殿防止剤を添加し、次いでpH約4ないし7で硫酸銅を添加することを特徴とする蛋白質の活性化方法。

【請求項4】酸性溶液のpHが約1ないし4である請求項1、2または3記載の活性化方法。

【請求項5】変性剤が尿素またはグアニジン塩酸塩である請求項1、2、3または4記載の活性化方法。

【請求項6】沈殿防止剤が糖、メルカブト基を有しないアミノ酸およびポリエチレングリコールの一種または二種以上である請求項1、2、3または4記載の活性化方法。

【請求項7】蛋白質がS-S結合を有する蛋白質である請求項1、2、3または4記載の活性化方法。

【請求項8】蛋白質が神経栄養因子である請求項1、2、3または4記載の活性化方法。

【請求項9】神経栄養因子がニューロトロフィン3である請求項8記載の活性化方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は遺伝子操作技術を用いて、原核細胞中に蛋白質、例えばニューロトロフィン3(NT-3)を発現後、活性化する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】異種蛋白質を原核細胞を用いて発現する際に、しばしばこれらの蛋白質は宿主細胞中で不溶性の不活性な封入体を形成し、更に封入体は宿主細胞の蛋白質により不純化されている。細胞中で大量の蛋白質を形成する際に、蛋白質の集合により不溶性の、たいていの場合は不活性な粒子になることが知られており、上記のような封入体の形成は、発現の際に発生する細胞中の高い蛋白質濃度の結果であると推測される。それ故、そのような蛋白質を例えば治療の目的に使用できるようにする前に、それを精製し且つその活性形に変換しなければならない。公知の方法によれば、不溶性の封入体を変性剤、例えば、グアニジン塩酸塩、または尿素を高濃度で添加して可溶化した後、希釈あるいは透析により変性剤の濃度を低減することにより活性な蛋白質を得ることができる。上記蛋白質の活性化の例として具体的には次のようなものが挙げられる。NGF等の不溶性蛋白を変性剤(ウレア、グアニジン塩酸塩)の存在下で酸性水溶液

(有機酸など)と接触させ、次いでアルカリ物質を加えてpHを上昇させた後再度pHを低下することを特徴とする不溶性融合異種蛋白質の可溶化方法(特開平1-257491号)、NGF/BDNFファミリーをレドックスバッファー中でリフォールディングする方法(特開平6-319549号)、還元剤を含まない溶液中でグアニジン塩酸塩、ウレアなどの変性剤を用いてNTを可溶化させる方法(特表平6-508036号)、β-NGFをレドックスバッファー中でリフォールディングする方法(特開平6-327489号)、あるいは、アルカリ性で金属イオン存在下でリフォールディングを行う方法[ジャーナル オブバイオロジカル ケミストリー(J. Biol. Chem.) 251, 6934 (1976)]等が挙げられる。しかしながら今まで、酸性で蛋白質の立体構造を復元した後、酸性から中性条件下で金属イオンを用いて蛋白質が効率よく活性化する方法は例がなかった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】一方、神経細胞の分化、維持、成長に関与するニューロトロフィンファミリーの内、ニューロトロフィン3(NT-3)についても、原核細胞中にNT-3を発現後、変性剤を用いて可溶化し、活性化する方法は既に知られており、特開平3-204897号公報等に記載されている。しかしながら、この方法を用いると活性なNT-3はごくわずかしか得られない。またNT-3をウレアに溶解後スルホニル化スルホニル化体を単離精製した後PEGを添加してリフォールディングする方法(WO95/30686号)があるが、この方法は煩雑である上に効率もよくない。更に、チャイニーズハムスター細胞(CHO)等、真核細胞を宿主としてNT-3を発現すると活性なNT-3は得られる(EP049993)が、真核細胞用の培地は高価であり、得られた蛋白の精製工程が煩瑣である等、工業的規模での製造には適当とはいえない。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、これらの欠点を解決すべく、原核細胞の高生産性を利用すると共に、効率的な再生方法を提供すべく鋭意研究を重ねた結果、遺伝子操作技術を用いてNT-3等の蛋白質を原核細胞において発現後、活性化する際に、細胞を破碎し、変性剤により可溶化した後の活性化工程において、塩酸、硫酸、りん酸、酢酸、ぎ酸、くえん酸等の酸性溶液(pH1~4、好ましくは2~4)で変性剤を変性作用を有しない濃度に低減或いは除去(pH1~4の酸性溶液に置換)した後に、更に不溶化を抑制する沈殿防止剤、例えばブドウ糖、ショ糖、ポリエチレングリコール200またはアルギニン等を含む溶液で希釈し、更にpH値を4~7、好ましくは5、5~6、5に調整した後、この酸性領域においてNT-3等の蛋白質の高次構造を回復させ、次いで酸化触媒として硫酸銅等の金属塩

を添加することにより、活性化が効率よく行なえることを見出し、本発明を完成したものである。即ち、本発明は、(1)蛋白質を遺伝子工学的に原核細胞宿主中に発現させて得られる封入体を変性剤で可溶化し、次いでゲル通過等により変性剤を除去し酸性溶液に置換したのち、沈殿防止剤を添加し、pH約4ないし7で金属塩を添加することを特徴とする蛋白質の活性化方法、(2)金属塩が硫酸銅である(1)記載の活性化方法、(3)蛋白質を遺伝子工学的に原核細胞宿主中に発現させて得られる封入体を変性剤で可溶化し、次いで変性剤を不作用濃度まで酸性溶液で希釈したのち、沈殿防止剤を添加し、次いでpH約4ないし7で硫酸銅を添加することを特徴とする蛋白質の活性化方法、(4)酸性溶液のpHが約1ないし4である(1)、(2)または(3)記載の活性化方法、(5)変性剤が尿素またはグアニジン塩酸塩である(1)、(2)、(3)または(4)記載の活性化方法、(6)沈殿防止剤が糖、メルカブト基を有しないアミノ酸またはポリエチレングリコールである請求項1、2、3または4記載の活性化方法、(7)蛋白質がS-S結合を有する蛋白質である(1)、(2)、(3)または(4)記載の活性化方法、(8)蛋白質が神経栄養因子である(1)、(2)、(3)または(4)記載の活性化方法、および(9)神経栄養因子がニューロトロフィン3である(8)記載の活性化方法、に関するものである。

【0005】本発明はいずれの蛋白質にも適用できるものであるが、NT-3に適用した場合に十分その効果が発揮されるので、以下、蛋白質としてNT-3を例に挙げて本発明を説明する。NT-3は、神経栄養因子(Nerve Growth Factor)と同一の遺伝子ファミリーに属する蛋白質であり、ポリメラーゼ連鎖反応により1990年クローニング〔フェブス・レターズ(FEBS Lett.)266, 187-191(1990), サイエンス(Science)247, 1446-1451(1990), ネイチャー(Nature)344, 339-341(1990)〕された神経栄養因子である。NT-3は、筋肉、関節、皮膚などの感覚器のレセプターからのシグナルを脊髄と脳に伝達する感覚神経の存続と維持並びに感覚神経機能の保護に重要な役割を果たすことが知られており、図1(記列番号:1)で示される構造を有する蛋白である。本発明で用いられる原核細胞としては、Escherichia coli(大腸菌)、Bacillus subtilis(枯草菌)、Serratia marcescens(セラチア)等が挙げられ、かつ中でもEscherichia coliが好ましい。これらの原核細胞の形質転換、培養等は常法に準じて行えばよい(特開平3-204897号参照)。例えば、本発明方法におけるNT-3をコードする塩基配列を有するcDNAを含有する発現型ベクターは、例えば、(i)NT-3産生細胞からメッセンジャーRNA(mRNA)を分離し、(ii)該mRNAから単鎖の相補DNA(cDNA)を、次いで二重鎖DNAを合成し、(iii)該相補DNAをファージまたは

プラスミドに組み込み、(iv)得られた組み換えファージまたはプラスミドで宿主を形質転換し、(v)得られた形質転換体を培養後、形質転換体から適当な方法、例えばNT-3の一部をコードするDNAプローブとのハイブリダイゼーションにより、あるいは抗NT-3抗体を用いたイムノアッセイ法により目的とするDNAを含有するファージあるいはプラスミドを単離し、(vi)その組み換えDNAから目的とするクローニングDNAを切り出し、(vii)該クローニングDNAまたはその一部を10 発現ベクター中のプロモーターの下流に連結する、ことにより製造することができる。NT-3をコードするmRNAは、種々のNT-3産生細胞、例えば睾丸ライディッヒ細胞や卵巣莢膜細胞、顆粒膜細胞、黄体細胞および間質細胞等の生殖細胞などから得ることができる。NT-3産生細胞からRNAを調製する方法としては、グアニジンチオシアネート法〔(ジャー・エム・チルグウィン(J.M. Chirgwin)ら、バイオケミストリー(Bio-chemistry),18, 5294(1979)]などが挙げられる。このようにして得られたmRNAを錆型とし、逆転写酵素を用いて、例えば岡山(H.Okayama)らの方法(モレキュラー・アンド・セルラー・バイオロジー(Molecular and Cellular Biology),2, 161(1982)および同誌3, 280(1983)]に従いcDNAを合成し、得られたcDNAをプラスミドに組み込む。cDNAを組み込むプラスミドとしては、たとえば大腸菌由来のpBR322〔ジーン(gene),2, 95(1977)〕, pBR325〔ジーン,4, 121(1978)〕, pUC12〔ジーン,19, 259(1982)〕, pUC13〔ジーン,19, 259(1982)〕、枯草菌由来のpUB110〔バイオケミカル・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション(Biochemical and Biophysical Research Communication),112, 678(1983)〕などが挙げられるが、その他のものであっても、宿主内で複製増殖されるものであれば、いずれをも用いることができる。またcDNAを組み込むファージベクターとしては、たとえばλgt11〔ヤング及びデーヴィス(Young, R., and Davis, R.)プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユー・エス・エー(Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.),80, 1194(1983)〕などが挙げられるが、その他のものであっても宿主内で増殖できるものであれば用いることができる。

【0006】プラスミドに組み込む方法としては、たとえば、ティー・マニアティス(T.Maniatis)ら、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning)コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory),第239頁(1982)に記載の方法などが挙げられる。またファージベクターにcDNAを組み込む方法としては、たとえばヒューン(Hyunh, T.V.)らの方法〔ティー・エヌ・エークローニング、ア・プラクティカル・アプローチ(DNA Cloning, A Practical Approach)1, 49(1985)〕などが挙げられる。このようにして得られた

プラスミドは、適当な宿主たとえばエシェリヒア(*Escherichia*)属菌、バチルス(*Bacillus*)属菌などに導入する。上記エシェリヒア属菌の例としては、エシェリヒア・コリ(*Escherichia coli*)K12D H1〔プロシージング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)60, 160(1968)〕, M 103〔スクレイック・アシックス・リサーチ,(Nucleic Acids Research),9, 309(1981)〕, J A 221〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(Journal of Molecular Biology),120, 517(1978)〕, H B 101〔ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(Journal of Molecular Biology),41, 459(1969)〕, C 6 00〔ジェネティックス(Genetics),39, 440(1954)〕MM2 94〔ジャーナル・オブ・ファーメンテーション・アンド・バイオエンジニアリング(Journal of Fermentation and Biotechnology)74, 67(1992)〕などが挙げられる。上記バチルス属菌としては、たとえばバチルス・サチリス(*Bacillus subtilis*)M I 114〔ジーン, 24, 255(1983)〕, 207-21〔ジャーナル・オブ・バイオケミストリー(Journal of Biochemistry)95, 87(1984)〕などが挙げられる。プラスミドで宿主を形質転換する方法としては、たとえばティー・マニアティス(T. Maniatis)ら、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning), コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory), 第249頁(1982)に記載のカルシウムクロライド法あるいはカルシウムクロライド/ルビジウムクロライド法などが挙げられる。またファージ・ベクターを用いる場合には、たとえば増殖させた大腸菌にインピトロパッケージング法を用いて導入することができる。NT-3 c DNAを含有するNT-3 c DNAライブラリーは上記の方法などで得ることが出来るが、市販品として購入することも可能である。このようにしてクローニ化されたNT-3 c DNAは必要があればプラスミド、例えばpBR322, pUC12, pUC13, pUC18, pUC19, pUC118, pUC119などにサブクローニングしてNT-3 c DNAを得ることができる。このようにして得られたc DNAの塩基配列を、たとえばマキサム・ギルバート(Maxam-Gilbert)法〔Maxam, A. M. and Gilbert, W., プロセーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユース・エー(Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.),74, 560(1977)〕あるいはジデオキシ法〔Messing, J. ら、スクレイック・アシックス・リサーチ(Nucleic Acids Research)9, 309(1981)〕によって決定し、既知のアミノ酸配列との比較からNT-3 c DNAの存在を確認する。以上のようにして、NT-3蛋白質をコードするc DNAが得られる。

〔0007〕上記のようにしてクローニ化されたNT-3蛋白質をコードするc DNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化して使用することが出来る。クローニ化されたc DNAから発現させたい領域を切り出し、発現に適したビークル(ベクター)中のブ

ロモーターの下流に連結して発現型ベクターを得ることができる。該c DNAはその5'末端に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端には翻訳終止コドンとしてのTAA, TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。さらに該c DNAを発現させるにはその上流にプロモーターを接続する。ベクターとしては、上記の大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13), 枯草菌由来プラスミド(例、pUB110, pTP5, pC194)などが挙げられる。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。形質転換する際の宿主がエシェリヒア属菌である場合は、T7プロモーター, trpプロモーター, lacプロモーター, recAプロモーター, λPLプロモーター, λppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター, SPO2プロモーター, penPプロモーターなどが好ましい。とりわけ宿主がエシェリヒア属菌でプロモーターがT7プロモーター, trpプロモーターまたはλPLプロモーターであることが好ましい。なお、発現にエンハンサーの利用も効果的である。このようにして構築されたNT-3蛋白質の成熟ペプチドをコードするc DNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造する。上記エシェリヒア属菌を形質転換するには、たとえばプロシージング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA),69, 2110(1972)やジーン,17, 107(1982)などに記載の方法に従って行なわれる。バチルス属菌を形質転換するには、たとえばモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス(Molecular & General Genetics),168, 111(1979)などに記載の方法に従って行なわれる。このようにして、NT-3をコードするc DNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体が得られる。

〔0008〕宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、たとえばグルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、たとえばアンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチーブ・リカ、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、パレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としてはたとえば塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは約5~8が望ましい。エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カザミ

ノ酸を含むM9培地〔ミラー(Miller), ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス(Journal of Experiments in Molecular Genetics), 4 31-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 19 72〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、たとえばイソプロビル- β -D-チオガラクトビラノシド(IPTG)、3 β -インドリルアクリル酸のような薬剤を加えることができる。宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15~43°Cで約3~24時間行い、必要により、通気や攪拌を加えるとともにできる。細胞の破碎は、常法で、たとえば超音波により実施できる。懸濁媒体として中性付近のpH値に調整した好適な緩衝液中で実施する。このようにして細胞を破碎した後に、不溶成分(封入体)を任意の方法で、遠心分離するか、濾過することにより分離する。異種の蛋白質をできる限り除去するため、たとえば水、リン酸緩衝液を用いて、場合により4M尿素で洗浄する。得られた沈殿(ペレット)を変性剤を用いて可溶化するが、変性剤としては、公知の変性剤、特にグアジニン塩酸塩または尿素を使用することができる。この可溶化に当っての変性剤の濃度は、グアジニン塩酸塩では4~8モル/リットル、好ましくは約6モル/リットル、尿素では5~9モル/リットル、好ましくは約8モル/リットルである。用いる変性剤溶液のpHは1~6、好ましくは2~4であり、使用する酸は、塩酸、硫酸、りん酸等の無機酸、酢酸、き酸、くえん酸等の有機酸のいずれでもよいが、くえん酸が好ましい。上記のようにして封入体の可溶化を行った後、遠心分離等で不純物を除去し、その上澄液について活性化を行なう。活性化に当っては、変性剤の濃度をpH1~4、好ましくはpH2~4において不作用濃度まで希釈或いは低減させる。グアジニン塩酸塩では0~1.2モル/リットル、好ましくは約0.1モル/リットル以下、尿素では0~1.6モル/リットル、好ましくは0.2モル/リットル以下まで低減させる。pH値を1~4、好ましくは2~4にするために使用する酸は、塩酸、硫酸、りん酸等の無機酸、酢酸、き酸、くえん酸等の有機酸のいずれでもよいが、酢酸が最も好ましく、該酸の濃度は0.05~0.5モル/リットル、好ましくは0.1~0.2モル/リットルである。酸溶液に置換した再活性化溶液は、0~40°C、好ましくは4~10°Cで0~30日、好ましくは2~5日間静置する。変性剤濃度の低減及び酸溶液に置換する方法としては、置換しようとする酸溶液で希釈する方法以外にも、一般に公知で常用の方法を用いることができ、例えば置換しようとする酸溶液で平衡化したセファデックスG-25(ファルマシアバイオテク(株))に通液したり或いは置換しようとする酸溶液に対して透析することにより行なうことができる。酸溶液に置換したのち希釈に用いる溶液は、蒸留水或いは適当な緩衝液で良いが、好ましくは1~500mM(より好ま

しくは20~100mM)のリン酸緩衝液(pH4~7)で希釈した後、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム等のアルカリあるいは塩酸、硫酸、りん酸などの酸でpH値を4~7、好ましくは5.5~6.5、更に好ましくは6.0に調整する。この時、不溶化、即ち沈殿を防止する目的で、ブドウ糖、ショ糖等の糖、メルカブト基を有さないアミノ酸(例、システイン以外の19種類の必須アミノ酸)、ポリエチレングリコールを単独で、或いは組み合わせて添加してもよいが、ショ糖を用いるのが好ましく、該濃度は5~30(W/V)%、好ましくは5~20(W/V)%である。最後にS-S結合を形成させるために添加する金属塩は、酸化触媒能を有する遷移金属(例、銅、鉄、コバルト、ニッケル)の無機酸(例、硫酸、硝酸、りん酸)や有機酸(例、くえん酸、酢酸)との塩でよいが、好ましくは硫酸銅で、該濃度は5~15μM、好ましくは10μMである。該活性化にあたっての温度は0~25°C、好ましくは4~10°Cである。静置する期間は0~20日、好ましくは2~10日である。再活性化工程に統一して行なう一つの精製工程は、透析或いは陽イオン交換体、たとえばSP-セファロース(ファルマシアバイオテク(株))により行なうことができる。

【0009】
【発明の実施の形態】常法に従い培養したNT-3発現原核細胞(例えは、E. coli等)の培養液から遠心分離により、NT-3の封入体を蓄積した菌体を集め、-80°Cに凍結保存した。10mM EDTA(pH7.0)中に上記の菌体を懸濁した後、超音波により細胞を破碎し、遠心分離(10,000 rpm、一時間)を行なった。得られたペレットを再度10mM EDTA(pH7.0)中に懸濁し、遠心分離を行いペレットの洗浄を行なった。同様の操作をもう一度繰り返し行い、再度ペレットを洗浄した。洗浄したペレットを50mMトリス塩酸/4M尿素/5mMジチオトリートール(pH8.0)でホモジナイズした後、遠心分離(10000 rpm、1時間)を行なった。次にペレットを20mMクエン酸/8M尿素(pH3.0)で溶解した後、遠心分離(10000 rpm、1時間)を行い、上澄液を得た。得られた上澄液に100mM酢酸溶液を加えて5倍に希釈(pH3.5)し、よく攪拌した後、100mM酢酸溶液で十分に平衡化したセファデックスG-25カラムを用いて、尿素を除去すると共に100mM酢酸溶液に置換し、4°Cで2日間静置した。次いで50mMりん酸緩衝液/12.5%ショ糖(pH6.8)を加えて5倍に希釈しpH値を6.0に調製した後、再度4°Cに2日間静置した。静置後、10μM濃度になるように硫酸銅を加えて溶解し、更に4°Cに2日間静置して活性化を行なった。

【0010】
【実施例】以下の参考例および実施例によって本発明を

より具体的に説明するが、本発明はこれらに制限されるものではない。

参考例1 (NT-3 DNAのクローニング)

E. coli Y1090にヒトグリオーマ由来の λ gt11cDNAライブラリー(Clontech Laboratories, Inc.)を感染させたのち、約 6×10^9 個のファージをNZCY培地(Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982に記載)にまき、37°Cで5時間培養した。次にナイロン膜をプレート上にのせ、1分間放置後、プレートからはずした。このナイロン膜を0.5M NaOH-1.5M NaCl、ついで1.5M NaCl-0.5M Tris-HCl pH8.0に浸し、さらに2×SSC(Molecular Cloning, A Laboratory Manual 前掲参照)に浸し、風乾後、80°Cで2時間放置した。ヒト β NGF(ネイチャー(Nature), 303, 821(1983))をコードするDNA(約0.38kb)を化学合成し、ニックトランスレーションによって[α - 32 P]dCTPでラベル化することによってプローブを作製した。上記で得られたナイロン膜とプローブを用いてMolecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory

NGFTE-1 : 5' TATGTACGGGAGCATAGACTACCCAGGGAGT 3' 35mer (配

列番号: 2)

NGFTE-2 : 5' ACTCCCCTCGGTGACTCTTATGCTCCCCGTACA 3' 33mer (配

列番号: 3)

NGFTE-3 : 5' TGCCAGG 3'

7mer

NGFTE-4 : 5' GATCCCTGGCATCCA 3'

15mer (配

列番号: 4)

一方、T7プロモーターを有する発現ベクターpET-3C(Rosenberg et al., ジーン(Gene), 56, 125(1987))をNdeIとBamHIで切断し、4.4kb NdeI-BamHI断片を単離した。上記で得られた4.4kb NdeI-BamHI断片と0.3kb NdeI-BamHI断片をT4DNAリガーゼで連結したのち、Escherichia coli DH1に導入し、得られたアンビシリン耐性の形質転換株(Escherichia coli DH1/pENGFT102およびEscherichia coli DH1/pENGFT103)から単離したプラスミドをそれぞれpENGFT102およびpENGFT103と命名した。

【0012】参考例3 (大腸菌用のNT-3の生産)

参考例2で得られたNT-3発現ベクターpENGFT103およびT7リゾーム発現ベクターpLyssを用いて、Escherichia coli MM294(DE3)(Molecular Endocrinology)

*ratory, 1982に記載の方法に従ってハイブリダイゼーションを行った。即ち、プローブを含むハイブリダイゼーション溶液にナイロン膜を浸し、65°Cで16時間保温した。該ナイロン膜を室温において2×SSC-0.1%SDSで洗浄したのち、60°Cにおいて1×SSC-0.1%SDSで洗浄した。次にオートラジオグラフィーによって陽性クローンを得た。このようにして得られたクローン λ βGN1321からEcoRIでcDNAを切り出し、プラスミドpUC118(宝酒造株式会社製)のEcoRI部位に挿入し、プラスミドpUNK5を得た。

【0011】参考例2 (大腸菌用のNT-3発現ベクターの構築)

参考例1で得られたプラスミドpUNK5に挿入されているNT-3 cDNAには、NT-3のN末端の11番目のチロシン残基をコードする領域付近にScaI部位が、NT-3の終止コドンの50塩基下流付近にNsiI部位が存在する。そこでpUNK5より0.3kb ScaI-NaiI断片を単離し、これにアダプター-NGFTE-1(35mer)、NGFTE-2(33mer)、NGFTE-3(7mer)、NGFTE-4(15mer)をT4DNAリガーゼで連結したのち制限酵素NdeIとBamHIで処理し、0.3kb NdeI-BamHI断片を得た。該アダプターを次に示す。

20 NGFTE-1 : 5' ACTCCCCTCGGTGACTCTTATGCTCCCCGTACA 3' 33mer (配
NGFTE-2 : 5' ACTCCCCTCGGTGACTCTTATGCTCCCCGTACA 3' 33mer (配
NGFTE-3 : 5' TGCCAGG 3'
NGFTE-4 : 5' GATCCCTGGCATCCA 3'

log, 4, 889(1990)]の形質転換を行い、形質転換体*E. coli* MM294(DE3)/pLyss, pENGFT103(IFO 15932, FERM BP-5483)を得た。また、参考例2で得られたNT-3発現ベクターpENGFT102およびT7リゾーム発現ベクターpLyssを用いて、Escherichia coli BL21(DE3)(Gene, 56, 125(1987))の形質転換を行い、形質転換体*E. coli* BL21(DE3)/pLyss, pENGFT102(IFO 14903, FERM BP-2529)を得た。形質転換体*E. coli* MM294(DE3)/pLyss, pENGFT103を50μg/mlのアンビシリンと15μg/mlのクロラムフェニコールを含LB培地(1%ペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム)1リットルを含む2リットル容フラスコで30°C、8時間振とう培養した。得られた培養液を20リットルの主醸酵培地(1.68%リン酸一水素ナトリウ

ム、0.3%リン酸二水素カリウム、0.1%塩化アンモニウム、0.05%塩化ナトリウム、0.05%硫酸マグネシウム、0.02%消泡剤、0.00025%硫酸第1鉄、0.0005%塩酸チアミン、1.5%ブドウ糖、1.5%カザミノ酸]を仕込んだ50リットル容酰酵槽へ移植して、30°Cで通気攪拌培養を開始した。培養液の濁度が約500ケレット単位になった時点で、100mg/1分のイソプロビル-β-Dチオガラクトピラノシド(IPTG)を添加し、さらに培養を続け、7時間後に培養を終了した。この培養終了液を遠心分離して、約340gの湿菌体を得、-80°Cに凍結保存した。

【0013】参考例4 (大腸菌用のNT-3の生産)
形質転換体E. coli MM294 (DE3)/pLYS S, pENGFT103を50μg/mlのアンビシリソと15μg/mlのクロラムフェニコールを含むLB培地 [1%ペプトン、0.5%酵母エキス、0.5%塩化ナトリウム] 1リットルを含む2リットル容フラスコで30°C、16.5時間振とう培養した。得られた培養液を20リットルのLB培地 [0.02%消泡剤、50μm/mlのアンビシリソ及び15μg/mlのクロラムフェニコールを含む] を仕込んだ50リットル容酰酵槽へ移植して、30°C、7時間通気攪拌培養した。この培養液を360リットルの主酰酵培地 [1.68%リン酸一水素ナトリウム、0.3%リン酸二水素カリウム、0.1%塩化アンモニウム、0.05%塩化ナトリウム、0.05%硫酸マグネシウム、0.02%消泡剤、0.00025%硫酸第1鉄、0.0005%塩酸チアミン、1.5%ブドウ糖、1.5%カザミノ酸] を仕込んだ500リットル容酰酵槽へ移植して、30°Cで通気攪拌培養を開始した。培養液の濁度が約500ケレット単位になった時点で、100mg/1分のイソプロビル-β-Dチオガラクトピラノシド(IPTG)を添加し、さらに培養を続け、5.5時間後に培養終了液を遠心分離して、約6kgの湿菌体を得、-80°Cに凍結保存した。

【0014】実施例1 (NT-3の活性化)
参考例3で得た湿菌体のうち40gを取り出し、この菌体に10mMEDTA (pH7.0) 240mlを加えて懸濁した後、氷冷下でソニファイヤー450(ブランソン社)を使って超音波により細胞を破碎し、遠心分離 (10000rpm、1時間)を行った。得られたベレットを同様の操作を2回行って洗浄した。次いで、50mMトリス塩酸/4M尿素/5mMジオトレイトル(DTT) (pH8.0)を160ml加えてホモジナイズした後遠心分離を行い、得られたベレットに20mMクエン酸/8M尿素 (pH3.0)を120ml加えて溶解後、遠心分離を行い、上澄液と沈殿物を分離し、沈殿物に対して再度同様の操作を行い、得られた上澄液と先に得られた上澄液を混合し240mlのベレット溶

解液を得た。この溶解液に100mM酢酸溶液を760ml加えて希釈し、同じく100mM酢酸で平衡化したセファデックスG-25カラム (11.3cmφ×50)に通液し、尿素を除去した変性NT-3溶液1646mlを得た。この溶液を4°Cで2日間静置した後、50mMリン酸緩衝液/12.5%ショ糖 (pH6.8)を加えて8.5lとし、5M水酸化ナトリウムおよび濃リン酸を用いてpH6.0に調整し、再び4°Cで2日間静置し活性化を行った。静置後200mM硫酸銅を最終濃度が10μMになるように加え、攪拌後、更に活性化を繰り返すため、再度4°Cに2日間静置した。

【0015】実施例2 (NT-3の精製)

実施例1で活性化を終了した溶液を100mMリン酸緩衝液/0.1%3-[3-コールアミドプロビル]ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホネート(CHAPS) (pH6.0)で平衡化したSP-セファロースFast Flowカラム (2.5cmφ×12cm、ファルマシアバイオテク社)に通液し、吸着後200mlの100mMリン酸緩衝液/0.1%CHAPS/200mM塩化ナトリウム (pH6.0)でカラムを洗浄し、次いで100mMリン酸緩衝液/0.1%CHAPS/400mM塩化ナトリウム (pH6.0)で溶出し、NT-3を含む溶出液を得た。この溶出液をResource 15RPCカラム (2cmφ×30cm、ファルマシアバイオテク社)に吸着した後、16%アセトニトリル/0.1%TFA-36%アセトニトリル/0.1%TFAの濃度勾配で溶出し、その溶出液を凍結乾燥し、約28mgのNT-3の白色粉末を得た。

【0016】実施例3 (NT-3の特徴決定)

a) SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を用いた分析
実施例2で得られたNT-3を100mM DTTを加えたSample buffer [Laemmli, ネイチャー (Nature), 227, 680 (1970)]に懸濁し100°Cで1分間加熱した後、4M濃度になるように尿素を加えて溶解し、0.1%SDSおよび4M尿素を含む12.5%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。泳動後のゲルをクーマシーブリリアントブルー(Coomassie brilliant blue)で染色したところ、単一バンドの蛋白が認められ、精製品はほぼ單一であった(図2)。

b) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた分析

5μgのNT-3を0.1%TFAで平衡化したAsahipak ODP-50 (4.6mmID×150mmL) カラムにかけ0-80%B (B=アセトニトリル/0.1%TFA) の濃度勾配で35分、0.5ml/分の流速で溶出した。235nmでの吸光度を検出した。図3の溶出曲線よりピーク1 (NT-3 ダイマ

13

→及びピーク2(NT-3モノマー) [ヨーロピアン ジャーナル オブ バイオケミストリー(Eur. J. Biochem.) 225, 995-1003 (1994)]以外は検出されず、精製品はほぼ単一であった。

c) アミノ酸組成分析

* [表1]

アミノ酸組成分析

アミノ酸	1モル当たりの残基数	NT-3の塩基配列から予測される値
Asx	10.9	11
Thr ¹¹	8.3	9
Ser ¹¹	11.2	12
Glx	11.2	11
Pro	2.0	2
Gly	8.0	8
Ala	4.7	5
Cys ¹¹		6
Val	8.7	9
Met	0.8	0
Ile	6.5	7
Leu	4.9	5
Tyr	4.6	5
Phe	0.9	1
His	4.0	4
Lys	10.0	10
Arg	9.8	10
Try ¹¹		4

成加水分解

(6N塩酸1%フェノール 110°C. 24-48hr, 加水分解の平均値)

1) 0時間に外挿した値

2) 未検出

ca. 20 μgを用いて分析を行った。

【0018】d) N末端アミノ酸配列分析

N末端アミノ酸配列を気相プロテインシーケンサー(アプライドバイオシステムズ モデル477A)を用いて決定した。その結果、得られたNT-3のN末端にはメチオニンが付加されていることのほかはcDNAの塩基

配列から推定したNT-3のN末端アミノ酸配列と一致した(表2)。

【0019】

【表2】

N末端アミノ酸配列分析

残基 No.	検出された PTH ¹¹ -アミノ酸 (pmol)	NT-3の塩基配列 から予測される アミノ酸
1	Met(866)	
2	Tyr(453)	Tyr
3	Ala(609)	Ala
4	Glu(261)	Glu
5	His(47)	His
6	Lys(271)	Lys
7	Ser(88)	Ser
8	His(30)	His
9	Arg(34)	Arg
10	Gly(253)	Gly
11	Glu(130)	Glu
12	Tyr(180)	Tyr
13	Ser(58)	Ser
14	Val(188)	Val
15	N. D.	Cys
16	Asp(55)	Asp
17	Ser(35)	Ser
18	Glu(53)	Glu
19	Ser(25)	Ser
20	Leu(123)	Leu

1 nmole用いて分析を行った。

1) フェニールチオヒダントイン

N.D. 未検出

【0020】e) C末端アミノ酸分析

C末端アミノ酸をアミノ酸分析計（ベックマン システム6300E）を用いて決定した。得られたNT-3はcDNAの塩基配列から推定したC末端アミノ酸と一致した（表3）。

【0021】

【表3】

C末端アミノ酸分析

NT-3	C末端アミノ酸		回収率 (%)
	Thr	15.9	
気相ヒドログン分解法 (100°C, 3.5hr).			

15 nmole用いて分析を行った。

【0022】実施例4 (NT-3の生物活性の測定)

ニワトリ有精卵を37.5°Cでふ卵器で8~10日間培養して胚発生を行った胎児から後根神経節(Dorsal root ganglion、以下DRG)を摘出した。DRGを0.125%トリプシン-Phosphate buffered saline (PBS) 液で37°C 20分処理し、ビベッティングを行うことで、細胞を分散させた。これを、10%牛胎児血清-ダルベッコ改変MEM培地-50 μg/mlカナマイシン

に懸濁し、37°C、5%CO₂存在下3~4時間培養することにより紡錘芽細胞等を培養シャーレに付着させ、非付着細胞のみを分取した。非付着細胞を遠心(800 r.p.m.、5分)により集め、20%牛胎児血清-ダルベッコ改変MEM培地/ハムF-12培地(混合比1:1)-1 μMサイトシンアラビノシド(AraC、シグマ社、USA)-50 μg/mlカナマイシンを含む培地に20000細胞/mlとなるように再懸濁し、0.5ml/ウェルずつ、ポリDL-オルニチン及びマウスマミンでコートした24穴プレートに播種した。この培地にNT-3の溶液を0.5~20 μl加え、37°C、5%CO₂存在下で2日間培養し、生存細胞数を計測すると、真核細胞由来のNT-3と同等のDRGの生存を促進する活性が認められた(図4)。図中●は実施例2で得られたNT-3を、○はポジティブコントロールとしてCHO細胞由来のNT-3(EP049993に従い、調製した)を示す。このようにして得られたNT-3は、細胞の分化、成長、増殖の促進、生存維持:遺伝子発現の上昇;蛋白質、酵素の誘導等の機構を研究するための試薬として有利に用いることができる。

【0023】

【発明の効果】 本発明では遺伝子工学を用いて原核

(10)

17

細胞中に発現したNT-3等の蛋白質の不活性体を効率よく活性化でき、上記のような作用を有するNT-3等の蛋白質の活性体を大量に調製できるものである。

【0024】

【配列表】

特開平9-262093

18

* 配列番号：1

配列の長さ：120

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：タンパク質

配列

Met Tyr Ala Glu His Lys Ser His Arg Gly Glu Tyr Ser Val Cys Asp
 1 5 10 15
 Ser Glu Ser Leu Trp Val Thr Asp Lys Ser Ser Ala Ile Asp Ile Arg
 20 25 30
 Gly His Gln Val Thr Val Leu Gly Glu Ile Lys Thr Gly Asn Ser Pro
 35 40 45
 Val Lys Gln Tyr Phe Tyr Glu Thr Arg Cys Lys Glu Ala Arg Pro Val
 50 55 60
 Lys Asn Gly Cys Arg Gly Ile Asp Asp Lys His Trp Asn Ser Gln Cys
 65 70 75 80
 Lys Thr Ser Gln Thr Tyr Val Arg Ala Leu Thr Ser Glu Asn Asn Lys
 85 90 95
 Leu Val Gly Trp Arg Trp Ile Arg Ile Asp Thr Ser Cys Val Cys Ala
 100 105 110
 Leu Ser Arg Lys Ile Gly Arg Thr
 115 120

【0025】配列番号：2

※ 鎮の数：一本鎮

配列の長さ：35

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

* 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TATGTACCGG GAGCATAAGA GTCACCGAGG GGAGT 35。

【0026】配列番号：3

★ 鎮の数：一本鎮

配列の長さ：33

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

★30 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ACTCCCCCTCG GTGACTCTTA TGCTCCGGT ACA 33。

【0027】配列番号：4

☆ 鎮の数：一本鎮

配列の長さ：15

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

☆ 配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

GATCCCTGGC ATGCC 15。

【図面の簡単な説明】

【図3】NT-3のHPLC分析チャートを示す。

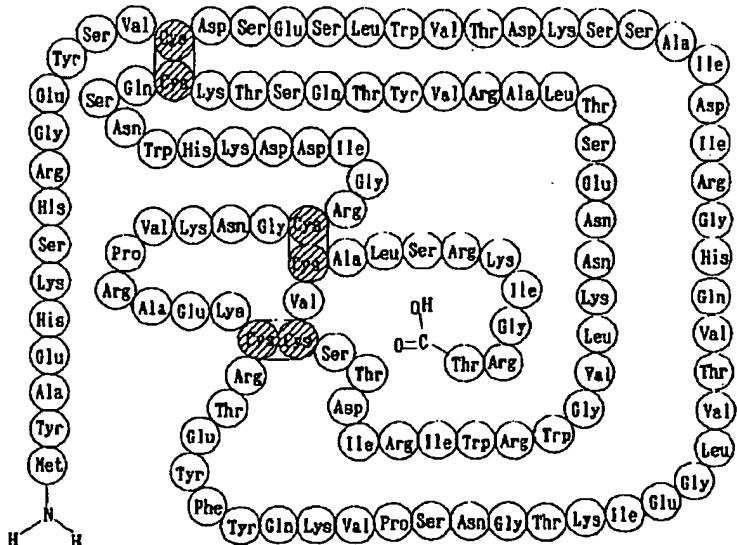
【図1】NT-3の構造を示す（N末端にMet付加）。

【図4】NT-3のDRG細胞を用いた生物活性の測定

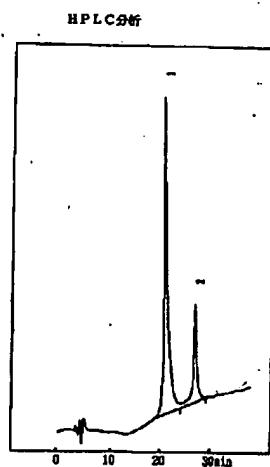
【図2】NT-3のSDS-PAGEの結果を示す。

40 結果を示す。

【図1】



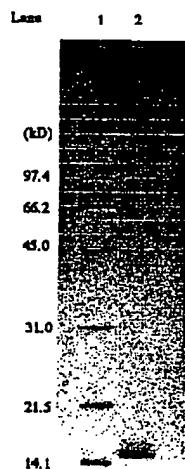
【図3】



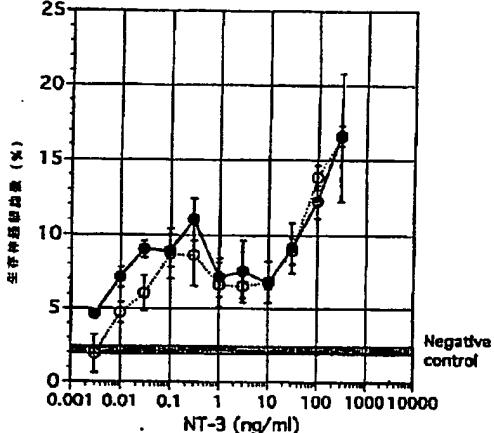
【図2】

SDS-PAGE

分析条件
濃縮用ゲル 5%ポリアクリルアミド
分離用ゲル 12.5%ポリアクリルアミドゲル



CHO及びE. coli由来NT-3の比較



Lane1: 分子量マーカー
Lane2: NT-3

BEST AVAILABLE COPY

【手続補正書】

【提出日】平成8年8月22日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図2

【補正方法】変更

【補正内容】

【図2】NT-3のSDS-PAGEの結果（電気泳動）を示す。

【手続補正2】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図2

【補正方法】変更

【補正内容】

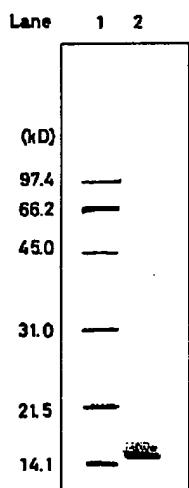
【図2】

SDS-PAGE

分析条件

濃縮用ゲル：6%ポリアクリルアミド

分離用ゲル：12.5%ポリアクリルアミドゲル



Lane 1: 分子量マーカー
Lane 2: NT-3

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁶ // A 61 K 38/22	識別記号 AAA AEE	序内整理番号 9282-4B	F I C 12 N 15/00 A 61 K 37/24	技術表示箇所 Z NAA AAA AEE
C 07 K 14/48				
(C 12 N 1/21				

(13)

特開平9-262093

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:19)